富锌微生物的筛选及其饲喂鸡的生物学效价评定[1]

卫爱莲　代张超　鲁　陈　丁小玲　刁　欢　闫一博　李吕木*

(安徽农业大学动物科技学院，合肥 230036)

摘　要：本试验旨在筛选出能将无机锌高效转化为微生物锌的微生物，并评定其作为锌源饲喂鸡的生物学效价。首先，从实验室已有的 16 株饲用微生物中，筛选出对无机锌具有高转化率的菌株，随后对影响其转化率的无机锌浓度、培养温度、培养时间和菌液接种量进行单因素优化和正交优化。然后，选用 18 周龄的海兰褐公鸡 20 只，随机分成 4 组，每组 5 个重复，每个重复 1 只。对照 1 组和对照 2 组饲喂无机锌（$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$），饲粮锌含量分别为 60 和 90 mg/kg；试验组 1 和试验 2 组饲喂酵母锌，饲粮锌含量也分别为 60 和 90 mg/kg。预试期和正试期各 5 d。结果表明，58 号菌种（酿酒酵母菌）为最优无机锌转化菌，无机锌转化为微生物锌的转化率达 52.68%；在无机锌浓度 1.5 mg/L、菌液接种量 4%、28 ℃条件下培养 66 h，其对无机锌转化为微生物锌的转化效率可达 98.01%；以该菌种转化的富锌酵母菌（酵母锌）饲喂鸡，其中锌相对硫酸锌中锌的相对生物学效价为 114.83%。由此可见，58 号菌种是一种对无机锌具有高转化率的富锌微生物。

关键词：富锌微生物；酿酒酵母菌；转化率；鸡；相对生物学效价

中图分类号：S831

锌是动植物及人类重要的必需微量金属元素，参与体内多种生化反应，如蛋白质的合成、DNA 和 RNA 的代谢、信号传导、基因表达以及调节细胞的凋亡[1]。不仅如此，锌还在促进动物的生长、免疫[2]、繁殖及脑神经等方面起着重要的作用[3]。并且动物年龄越小，锌对动

收稿日期：2018-03-16
基金项目：安徽省科技公关项目（1804g07020169）
作者简介：卫爱莲（1992—），女，安徽宣城人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail： 978396213@qq.com
*通信作者：研究员，博士生导师，E-mail： llm56@ahau.edu.cn

物的影响越大[4]。仔猪缺锌可导致生长受阻，皮肤出现不全角化症[5]。研究还发现，饲喂高于动物营养需要量的高锌饲粮，对鸡[6]、羊[7]、猪[8]等动物具有促生长作用，因而生产上普遍采用高锌饲粮[9]。由于无机锌价格低廉，硫酸锌（$ZnSO_4$）等无机锌是常用的饲粮锌营养源。但用无机锌作为锌源，其吸收利用率低[10-11]且易造成环境的污染，所以寻找新的锌源迫在眉睫。因此，利用率较高的微生物锌受到了广泛重视。郭雪娜等[12]在 402 株酵母菌中筛选到了 1 株可以将硫酸锌高效转化为酵母锌的菌株，其锌含量可达 9.3 mg/g。李宇兴等[13]筛选的富锌酵母，对无机锌的转化率达 50%。Cha 等[14]比较了酿酒酵母菌 FF-10 对氯化锌、氧化锌和硫酸锌等不同无机锌转化为微生物锌的效果，发现氯化锌转化效率更高。大鼠饲喂试验表明，酵母锌的利用率要高于硫酸锌[15]。随着国家不断加大环境保护的力度，为提高锌的在动物体内的利用率，降低粪尿中锌残留量，一些利用率高的锌源，如氨基酸螯合锌[16]等更受欢迎，但是由于其价格较高而限制了其在生产上的广泛应用。因此，研发价格低廉、制备方法简单的微生物锌源显得尤为必要。为此，本研究拟从实验室保存的饲用菌种中筛选出高效转化无机锌为微生物锌的菌株，以期开发出价格相对低廉的微生物锌，为绿色畜牧业的发展做出积极贡献。

1　材料与方法

1.1　菌株、试剂与试验动物

试验所用的 16 株饲用菌种，其编号分别为 2、3、4、6、8、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、58，均为本实验室保存的菌株，其中乳酸菌 1 株，酵母菌 12 株，芽孢杆菌 3 株。锌标准液（国家有色金属及电子材料分析测试中心）、硫酸锌（西陇科学股份有限公司）、葡萄糖（烟台市双双化工有限公司）均为分析纯。试验鸡为健康的 18 周龄的海兰褐公鸡，购自安徽省合肥市长丰县安禽禽业有限公司。

1.2　培养基

1.2.1　酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(YPD)培养基

葡萄糖 20 g，土豆 200 g，pH 自然，水 1 L，若为固体培养基则加入 20 g 琼脂。

1.2.2　营养肉汤(NB)培养基

牛肉膏 5 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，水 1 L，若为固体培养基则加入 20 g 琼脂。

1.2.3　乳酸细菌(MRS)培养基

蛋白胨 10 g，牛肉膏 10 g，酵母粉 5 g，葡萄糖 20 g，乙酸钠 5 g，柠檬酸氢二胺 2 g，吐温-80 1 mL，磷酸氢二钾 2 g，七水硫酸镁 0.2 g，七水硫酸锰 0.05 g，若为固体则加入 20 g 琼脂。

1.2.4　无机锌转化培养基

在 YPD、NB 和 MRS 培养基中加入相应浓度的硫酸锌，以上培养基的灭菌条件为 121 ℃、15 min。

1.3　主要仪器

火焰原子吸收光谱仪（ZEEnit700p，德国耶拿分析仪器股份公司）、高速冷冻离心机（JW-3021HR，安徽嘉文装备有限公司）、恒温摇床（ZHP-250，上海三发科技有限公司）、烘箱（DGT-G82A，合肥达斯卡特科学有限公司）、消化炉（ML-3-4，上海科恒实业发展有限公司）。

1.4　锌含量的测定

1.4.1　标准曲线的绘制

按照 GB/T 5009.14-2017《食品安全国家标准 食品中锌的测定》[17]中火焰原子吸收吸收光谱法绘制锌标准曲线。标准曲线的线性回归方程为：

Y=0.3026x+0.0127。

1.4.2 微生物锌含量的测定

待测培养液 4 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，用超纯水配制 0.9%的生理盐水，洗涤 3 次后收集菌体，在 60 ℃烘箱中烘干至恒重，参照 GB/T 5009.14-2017《食品安全国家标准 食品中锌的测定》[17]进行消化分解，再稀释 5、10、20 倍进行上机测定。

1.5 富锌微生物的筛选

取备选菌种按照各自的标准培养条件培养好后，分别接种到 100 mL 对应的 PDA、NB 和 MRS 液体培养基中，酵母菌于 28 ℃、120 r/min 震荡培养 2 d，芽孢杆菌于 37 ℃、120 r/min 震荡培养 1 d，乳酸菌于 37 ℃静止培养 2 d。然后在固体培养基中进行 3 次纯化，挑取菌株接入无机锌浓度为 2 mg/L 的对应的 PDA、NB 和 MRS 液体培养基中，酵母菌培养和芽孢杆菌培养 3 d，乳酸菌培养 4 d。培养结束用高速冷冻离心机对菌液进行离心（4 000 r/min、5 min），弃去上清液，再用去离子水冲洗 3 遍后在透析袋中透析，直至上清液中检测不出锌离子，再离心收集沉淀得到菌体，然后在 60 ℃的烘箱中烘干至恒重[18]。以微生物转化无机锌为微生物锌的转化率为依据，筛选出对无机锌转化率高的菌株。

1.6 目标菌种培养条件的单因素优化

对无机锌浓度、培养温度、培养时间和菌液接种量 4 个因素依次进行优化，根据菌种对无机锌转化为微生物锌转化率的高低，筛选出最佳转化率的组合参数。以上一次筛选的最优转化率因素作为下一次最优转化率因素筛选时的条件。

1.6.1 无机锌浓度的优化

设置 5 个无机锌浓度，分别为 2、4、6、8 和 10 mg/L，每个处理 2 个重复，菌液接种量为 2%，28 ℃、120 r/min 震荡培养 72 h。

1.6.2 培养温度的优化

设置 5 个培养温度，分别为 26、27、28、29 和 30 ℃，每个处理 2 个重复，无机锌浓度为 1.6.1 所确定的无机锌浓度，其余条件与 1.6.1 相同。

1.6.3　培养时间的优化

设置 5 个培养时间，分别为 48、66、72、84 和 96 h，每个处理 2 重复，培养温度为 1.6.2 所确定的培养温度，其余条件与 1.6.2 相同。

1.6.4　菌液接种量的优化

设置 5 个菌液接种量，分别为 1%、2%、3%、4%和 5%，每个处理 2 重复，培养时间为 1.6.3 所确定的培养时间，其余条件与 1.6.3 相同。

1.7　目标菌种培养条件的正交优化

在单因素试验的基础上，采用 L_9（3^4）设计对无机锌浓度（A）、培养温度（B）、培养时间（C）和菌液接种量（D）4 因素进行 3 水平正交优化，进一步确定其将无机锌转化为微生物锌的最佳组合条件，每个处理 3 个重复。各因素水平为：无机锌浓度分别为 1.5、2.0 和 2.5 mg/L，培养温度分别为 27.5、28.0 和 28.5 ℃，培养时间分别为 66、72 和 78 h，菌液接种量分别为 2%、3%和 4%。

1.8　无机锌转化微生物锌的转化率计算

微生物转化后菌体中的含锌量与培养基中添加的无机锌含量的百分比即为无机锌转化为微生物锌的转化率，其计算公式为：

转化率（%）=100×微生物转化后菌体中的含锌量/为培养基中添加的无机锌含量。

1.9　酵母锌饲喂鸡的相对生物学效价评定

将 20 只健康的 18 周龄的海兰褐公鸡随机分 4 组，即 2 个对照组和 2 个试验组，每组 5

个重复，每个重复 1 只，单笼饲养，各组间体重差异不显著（P>0.05）。对照 1 组和对照 2 组饲喂无机锌（$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$），饲粮锌含量分别为 60 和 90 mg/kg；试验组 1 和试验 2 组饲喂酵母锌（以上述菌种转化的富锌酵母菌），饲粮锌含量也分别为 60 和 90 mg/kg。预试期和正试期各 5 d，每只鸡日定量饲喂 100 g，于 08:00 和 16:00 分 2 次饲喂。采用全收粪法[19]测定饲粮锌的表观代谢率，进而计算出酵母锌中的锌相对于硫酸锌中锌的相对生物学效价。试验在安徽农业大学动物代谢室进行，采用玉米-豆粕型饲粮，饲粮组成及营养水平见表 1，微量元素预混料组成见表 2。

表 1　饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis)　%

项目 Items	对照组 1 Control group 1	对照组 2 Control group 2	试验组 1 Test group 1	试验组 2 Test group 2
原料 Ingredients				
玉米 Corn	72.00	72.00	72.00	72.00
豆粕 Soybean meal	22.22	22.22	22.22	22.22
麸皮 Wheat bran	1.70	1.70	1.70	1.70
石粉 Limestone	0.90	0.90	0.90	0.90
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.60	1.60	1.60	1.60
复合维生素 Multi-vitamin	0.08	0.08	0.08	0.08
蛋氨酸 Met	0.10	0.10	0.10	0.10
食盐 NaCl	0.40	0.40	0.40	0.40
对照 1 组微量元素预混料 Control group 1 trace element premix	1.00			
对照 2 组微量元素预混料 Control group 2 trace element premix		1.00		
试验 1 组微量元素预混料 Test group 1 trace element premix			1.00	
试验 2 组微量元素预混料 Test group 2 trace element premix				1.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels				
代谢能 ME/（MJ/kg）	11.70	11.70	11.70	11.70
粗蛋白质 CP	16.00	16.00	16.00	16.00
钙 Ca	0.90	0.90	0.90	0.90
总磷 TP	0.65	0.65	0.65	0.65
赖氨酸 Lys	0.65	0.65	0.65	0.65
蛋氨酸 Met	0.30	0.30	0.30	0.30
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.56	0.56	0.56	0.56
钠 Na	0.18	0.18	0.18	0.18

每千克复合维生素含 Per kg multi-vitamin contained: VA 7 000 IU，VD_3 8 000 IU，VE 30 IU，VC 5 mg，VB_1 13 mg，VB_2 30 mg，VB_6 3 mg，叶酸 folic acid 3 mg，泛酸 pantothenic acid 20 mg，烟酸 nicotinic acid 30 mg。

表 2　微量元素预混料组成

Table 2　Composition of trace element premix　%

项目 Items	对照组 1 Control group 1	对照组 2 Control group 2	试验组 1 Test group 1	试验组 2 Test group 2
七水合硫酸亚铁 $FeSO_4•7H_2O$	7.96	7.96	7.96	7.96
亚硒酸钠 $NaSeO_3$	0.006 5	0.006 5	0.006 5	0.006 5
碘化钾 KI	0.009	0.009	0.009	0.009
一水合硫酸锰 $MnSO_4•H_2O$	4.922	4.922	4.922	4.922
五水合硫酸铜 $CuSO_4•5H_2O$	0.62	0.62	0.62	0.62
七水合硫酸锌 $ZnSO_4•7H_2O$	5.28	7.917		
酵母锌 Yeast zinc			10.530	15.795
石粉 Limestone	81.19	78.55	75.94	70.679

酵母锌中锌含量 Zinc content of yeast zinc：11.396 mg/g。

锌的相对生物学效价的有关公式为：

每日锌食入量（g）=每日采食量×饲粮中锌含量；

每日粪尿锌排出量（g）=每日粪尿排出量×粪尿中锌含量；

每日锌存留量（g）=每日锌食入量-每日粪尿锌排出量；

对照组食入锌增量（g）=对照 2 组食入锌量-对照 1 组食入锌量；

对照组锌存留增量（g）=对照 2 组锌存留增量-对照 1 组锌存留增量；

试验组食入锌增量（g）=试验 2 组食入锌量-试验 1 组食入锌量；

试验组锌存留增量（g）=试验 2 组锌存留增量-试验 1 组锌存留增量；

锌生物学利用率（%）=100×锌存留增量/食入锌增量；

锌的相对生物学效价（%）=100×试验组锌生物学利用率/对照组锌生物学利用率。

1.10　数据分析

数据先用 Excel 2007 进行整理，再用 SPSS 20.0 进行分析。单因素试验数据进行单因素方差分析，正交试验数据进行方差分析及极差分析。所有试验结果均用平均值±标准差表示，显著水平为 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从表 3 中可以看出，58 号菌种（酿酒酵母菌）转化无机锌为微生物锌的转化率最高，达到了 52.68%。因此，以 58 号菌种进行后续的研究，以下皆称该菌种为酿酒酵母菌。

表 3 16 株饲用微生物菌种转化无机锌为微生物锌的转化率

Table 3 Conversion rates of inorganic zinc to microbial zinc by 16 strains of feed microorganisms

编号 Number	菌种名称 Name of strain	转化率 Conversion rate	编号 Number	菌种名称 Name of strain	转化率 Conversion rate
2	植物乳酸菌	1.35±0.03	16	毕赤酵母菌	9.85±0.05
3	酿酒酵母菌	5.74±0.06	18	毕赤酵母菌	4.14±0.11
4	酿酒酵母菌	2.36±0.02	19	毕赤酵母菌	8.60±0.01
6	腊样芽孢杆菌	3.89±0.08	20	毕赤酵母菌	11.34±0.01
8	枯草芽孢杆菌	11.76±0.01	21	毕赤酵母菌	2.13±0.01
13	酿酒酵母菌	8.08±0.08	22	毕赤酵母菌	5.17±0.01
14	酿酒酵母菌	8.57±0.03	23	地衣芽孢杆菌	20.57±0.01
15	酿酒酵母菌	25.13±0.11	58	酿酒酵母菌	52.68±0.04

2.2 单因素优化

2.2.1 无机锌浓度对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

从表 4 中可以看出，酿酒酵母菌对无机锌的转化率随着无机锌浓度的增加而逐渐降低，当无机锌浓度为 2 mg/L 时，转化率最高，达到了 64.48%，显著高于其他各组（P＜0.05）。

这说明无机锌浓度为 2 mg/L 时，酿酒酵母菌的富锌能力最好。

2.2.2　培养温度对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

从表 4 中可以看出，随着培养温度的升高，酿酒酵母菌对无机锌的转化率先逐渐升高再逐渐降低。28 ℃时转化率最高，为 76.87%，与 26 和 30 ℃时差异显著（$P<0.05$），与 27 和 29 ℃组差异不显著（$P>0.05$）。因此，选择 28 ℃作为酿酒酵母菌转化无机锌的培养条件。

2.2.3　培养时间对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

从表 4 中可以看出，培养时间为 72 h 时，酿酒酵母菌对无机锌的转化率最高，达到 78.18%，显著高于 48 和 66 h（$P<0.05$），然后随着培养时间的增加，转化率差异不显著（$P>0.05$）。因此，选择酿酒酵母菌转化无机锌的培养时间为 72 h。

2.2.4　菌液接种量对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

从表 4 中可以看出，随着菌液接种量的增加，酿酒酵母菌对无机锌的转化率先逐渐升高后降低，菌液接种量为 4%时，酿酒酵母菌对无机锌的转化率最高，达到了 78.57%，显著高于菌液接种量为 1%和 2%时（$P<0.05$）。随后再增加菌液接种量，酿酒酵母菌对无机锌的转化率不再增加，但与菌液接种量为 3%时差异不显著（$P>0.05$）。因此，选择酿酒酵母菌转化无机锌的菌种接种量为 4%。

由单因素试验设计结果可得知，酿酒酵母菌转化无机锌的最佳条件为：无机锌浓度 2 mg/L，培养温度 28 ℃，培养时间 72 h，菌液接种量 4%。

表 4　无机锌浓度、培养温度、培养时间和菌液接种量对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

Table 4　Effects of inorganic zinc concentration, culture temperature, culture time and

inoculum quantity of bacteria on inorganic zinc conversion capability of *Saccharomyces cerevisiae*

无机锌浓度 Inorganic zinc concentration /(mg/L)	转化率 Conversion rate/%	培养温度 Culture temperature/ °C	转化率 Conversion rate/%	培养时间 Culture time/h	转化率 Conversion rate/%	菌液接种量 Inoculum quantity of bacteria/%	转化率 Conversion rate/%
2	64.48 ± 0.18^{a}	26	29.59 ± 0.15^{c}	48	64.69 ± 0.20^{c}	1	68.15 ± 0.87^{b}
4	38.45 ± 0.24^{b}	27	70.97 ± 5.47^{ab}	66	65.33 ± 0.21^{b}	2	69.61 ± 0.77^{b}
6	23.88 ± 0.97^{c}	28	76.87 ± 2.02^{a}	72	78.19 ± 0.04^{a}	3	78.01 ± 1.92^{a}
8	19.86 ± 1.51^{d}	29	71.27 ± 3.17^{ab}	84	78.15 ± 0.05^{a}	4	78.57 ± 0.34^{a}
10	17.88 ± 0.95^{d}	30	64.44 ± 2.31^{b}	96	78.19 ± 0.02^{a}	5	78.48 ± 1.16^{a}

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同小写字母表示差异不显著（$P>0.05$）。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.3 正交优化

从表 5 中可以看出，影响试验结果因素的先后顺序为：A>B>D>C，即影响酿酒酵母菌转化无机锌能力的因素依次为无机锌浓度、培养温度、菌液接种量和培养时间。由 K 值可得出最佳组合为：$A_1B_2C_1D_3$，即无机锌浓度 1.5 mg/L，培养温度 28 ℃，培养时间 66 h，菌液接种量 4%。在此最优条件下进行正交的验证，其结果为无机锌的转化率达 98.01%，高于所有正交试验的所有组合，证明该组合即为酿酒酵母菌转化无机锌的最优组合条件。

表 5 正交试验设计结果的极差分析

Table 5 Range analysis of orthogonal experimental design results

试验序号	转化条件 Conversion conditions	转化率

Experimental No.	无机锌浓度 Inorganic zinc Concentration (A)	培养温度 Culture temperature （B）	培养时间 Culture time （C）	菌液接种量 Inoculum quantity of bacteria （D）	Conversion rate/%
1	1	1	1	1	94.79±0.14
2	1	2	2	2	95.31±0.13
3	1	3	3	3	94.81±0.41
4	2	1	2	3	80.73±0.92
5	2	2	3	1	89.00±0.19
6	2	3	1	2	78.02±0.57
7	3	1	3	2	74.03±0.56
8	3	2	1	4	93.92±0.91
9	3	3	2	1	73.40±2.66
K_1	284.91	249.54	266.73	257.19	
K_2	247.75	278.24	249.45	247.36	
K_3	241.35	246.23	257.84	269.46	
极差 R	43.55	32.01	17.28	22.10	

从表 6 中可以看出，无机锌浓度、培养时间和菌液接种量对转化率有极显著的影响（$P<0.01$），培养温度对转化率有显著的影响（$P<0.05$），各因素 3 水平之间差异显著（$P<0.05$）。

表 6　Duncan 氏多重比较结果

Table 6　Results of Duncan multiple comparison

因素 Factors	显著性 Significance	水平 Levels 1	2	3
无机锌浓度 Inorganic zinc concentration	**	94.97[a]	82.58[b]	80.45[c]
培养温度 Culture temperature	*	83.18[b]	92.75[a]	82.08[c]
培养时间 Culture time	**	88.91[a]	83.15[c]	85.95[b]

菌液接种量 Inoculum quantity of bacteria	**	85.73[b]	82.45[c]	89.82[a]

**表示因素各水平多重比较时差异极显著（P＜0.01），*表示因素各水平多重比较时差异显著（P＜0.05），同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

** indicated extremely significant differences at each level of multiple comparisons (P<0.01), * indicated significant differences at each level of multiple factor comparisons (P<0.05), and values the same row with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05).

2.4 酵母锌饲喂鸡的相对生物学效价评定

从表 7 中可以看出，酵母锌中锌的生物学利用率比硫酸锌中锌高 10.33%，其相对于硫酸锌中锌的相对生物学效价为 114.83%，表明该酵母锌是优于硫酸锌的一种锌添加剂。

表 7 酵母锌中锌的相对生物学效价

Table 7 Relative biological value of yeast zinc

项目 Items	食入增量 Feeding increment（mg/d•只）	存留量 Retention（mg/d•只）	生物学利用率 Biological efficiency/%	相对生物学效价 Relative biological value/%
对照组 Control group	3	2.08	69.67	
试验组 Test group	3	2.40	80.00	114.83

3 讨 论

3.1 培养条件的优化

不同的微生物对微量元素的吸附机制和吸附能力不同，所以在选用微生物转化无机微量元素来改善微量元素的利用率时，菌种的选择就显得尤为重要，常常要根据吸附的元素不同来选择不同的微生物进行转化微量元素。与此同时，微量元素的浓度、培养温度、培养时间、

菌液接种量等也对微生物转化无机微量元素的能力有着重要的影响[20]。

3.1.1　无机锌浓度对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

无机锌浓度对酿酒酵母菌转化无机锌的能力有较大的影响，本试验最佳的无机锌浓度为1.5 mg/L，此条件下转化率达到了98.01%。无机锌浓度主要影响酿酒酵母菌的活力，当无机锌浓度过高，可能影响酵母菌的繁殖力，这是因为金属元素能与酿酒酵母菌中的蛋白质结合，使其变性失活，破坏蛋白质的正常生理功能[19]，从而抑制了酿酒酵母菌的生长；无机锌浓度过低时，不能满足酿酒酵母菌的营养需要，使其生长延长[21]。杨靖鹏[22]研究表明，无机锌转化为微生物锌的转化率为69.25%，低于本试验的转化率，这可能是因为本试验的无机锌浓度较低，有利于酿酒酵母菌将无机锌尽可能多的转化为微生物锌，提高无机锌的利用率，减少无机锌对环境的污染。

3.1.2　培养温度对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

培养温度影响微生物的生长，酵母在 25～32 ℃均可生长，但在不同的温度下其生长的速度和合成的有机物不同，因此要根据转化的微量元素选择合适的温度。在富集转化的过程中，温度过高会使酿酒酵母菌中的磷脂分子在膜内进行快速的侧向扩散，增加膜脂的流动性，破坏膜的完整性，从而导致酿酒酵母菌的存活率下降[23]。本试验所筛选的培养温度与康毅等[24]所研究的酿酒酵母菌需要的温度条件是相同的。

3.1.3　培养时间对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

培养时间对酿酒酵母菌转化无机锌的能力有较大的影响，培养时间会影响微生物的生长及其对无机锌富集转化量的多少，培养时间过短，酿酒酵母菌未生长完全；培养时间过长，酿酒酵母菌会产生副产物，从而抑制其增长。本试验筛选出的培养时间与 Chreptowicz 等[25]所筛选酵母所需的培养时间是一样的。

3.1.4　菌液接种量对酿酒酵母菌转化无机锌能力的影响

菌液接种量主要影响无机锌向微生物锌转化的速率，菌液接种量过低，微生物生长缓慢，杂菌污染率增加，转化时间延长；菌液接种量过高，微生物生长迅速，在短时间内积聚大量代谢副产物，抑制微生物活性物质的合成[26]。本试验的菌液接种量为 4%，低于孔林[27]研究的菌液接种量，可能的原因是本试验的菌液浓度高于其菌液浓度。

3.2　酵母锌饲喂鸡的相对生物学效价评定

在集约化饲养的模式下，动物在生产过程中会集中排泄大量的粪便和尿液，给环境造成了巨大污染，其中微量元素的大量排出对环境造成不可逆的损害，不仅如此，对动物本身和周围植物也造成了一定程度的损伤。其中锌在动物生产中的排放不仅仅与饲粮中添加水平密切相关[28]，也与动物自身对锌的利用率有关，即与锌的生物学效价有密切的关系[29]。因此，提高锌的利用率对动物本身和环境均有益。本研究筛选出的富锌酵母不仅对无机锌具有较高的转化率，并且其饲喂鸡可以显著提高鸡对锌的生物学利用率，减少粪中锌排放，其锌相对于无机硫酸锌中锌的相对生物学效价高达 114.83%，这一结果与其他微生物锌的结果一致[30-31]，与索海青[31]测得的微生物锌中锌的相对硫酸锌中锌的相对生物学效价为 115%高度一致。

本试验中酵母锌的利用率高于硫酸锌，可能的原因是锌被酿酒酵母菌富集在胞内，以胞内锌的形式进入动物消化道，其结构稳定，不易解离，并且能抵抗与其他配体如铜锌结合蛋白等的干扰作用，以一种完整的结构形式运输到小肠的吸收部位，所以酵母锌较硫酸锌对动物具有更高的生物学利用率，这可能符合有机锌的内源吸收假说[8]。大量研究表明，蛋氨酸锌较硫酸锌不但具有更高的生物利用率，而且还同时具有免疫和抗氧化活性[32-33]，但酵母锌是否像蛋氨酸锌一样也具有免疫和抗氧化活性呢？这尚待进一步研究。

4　结　论

① 酿酒酵母菌对无机锌的转化率最高，可达 52.26%。

② 酿酒酵母菌转化无机锌的最优条件为：无机锌浓度 1.5 mg/L，培养温度 28 ℃，培养时间 66 h，菌液接种量 4%；该条件下，可将 98.01%的无机锌转化为微生物锌。

③ 以酿酒酵母菌转化的酵母锌饲饲喂鸡，其锌的利用率是硫酸锌中锌的 114.83%。

参考文献：

[1] ANDREINI C,BERTINI I.A bioinformatics view of zinc enzymes[J].Journal of Inorganic Biochemistry,2012,111:150–156.

[2] SHE Y,HUANG Q,LI D F,et al.Effects of proteinate complex zinc on growth performance,hepatic and splenic trace elements concentrations,antioxidative function and immune functions in weaned piglets[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2017,30(8):1160–1167.

[3] ZHU Y W,LI W X,LU L,et al.Impact of maternal heat stress in conjunction with dietary zinc supplementation on hatchability,embryonic development,and growth performance in offspring broilers[J].Poultry Science,2017,96(7):2351–2359.

[4] MATTE J J,GIRARD C L,GUAY F.Intestinal fate of dietary zinc and copper:postprandial net fluxes of these trace elements in portal vein of pigs[J].Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,2017,44:65–70.

[5] BIN B H,BHIN J,TAKAISHI M,et al.Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development:implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2017,114(46):12243–12248.

[6] MİDİLLİ M,SALMAN M,MUĞLALI Ö H,et al.The effects of organic or inorganic zinc and

microbial phytase,alone or in combination,on the performance,biochemical parameters and nutrient utilization of broilers fed a diet low in available phosphorus[J].Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,2014,20(1):89–96.

[7] EREN V,GULES O,EREN U,et al.The utilization of organic copper and zinc in the feeding of sheep during the pre and post-partum period[J].Journal of Animal and Veterinary Advances,2012,11(7):890–897.

[8] 王彬,刘路杰,祝佳,等.纳米氧化锌对断奶仔猪生长性能、血清免疫和生化指标的影响[J].动物营养学报,2016,28(11):3626-3633.

[9] BRAUDE R.Some observations on the need for copper in the diet of fattening pigs[J].The Journal of Agricultural Science,1945,35(3):163-167.

[10] UNIYAL S,GARG A K,JADHAV S E,et al.Comparative efficacy of zinc supplementation from different sources on nutrient digestibility,hemato-biochemistry and anti-oxidant activity in guinea pigs[J].Livestock Science,2017,204:59–64.

[11] CUI H,ZHANG T T,NIE H,et al.Effects of different sources and levels of zinc on growth performance,nutrient digestibility,and fur quality of growing-furring male mink (*Mustela vison*)[J].Biological Trace Element Research,2017,182(2):257–8264.

[12] 郭雪娜,傅秀辉,何秀萍,等.富锌酵母的选育及培养条件研究[J].微生物学报,2004,44(2):240–243.

[13] 李宇兴,潘敬梅,黄新河,等.富锌酵母的筛选和培养条件优化[J].食品与发酵科技,2016,52(5):19–22.

[14] CHA J Y,CHO Y S.Determination of optimal conditions for zinc-hyperaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae* FF-10[J].Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,2009,52(3):227–233.

[15] ZHANG S Q,ZHANG Y,PENG N,et al.Pharmacokinetics and biodistribution of zinc-enriched yeast in rats[J].Scientific World Journal,2014,2014:217142.

[16] YAN J Y,ZHANG G W,ZHANG C,et al.Effect of dietary organic zinc sources on growth performance,incidence of diarrhoea,serum and tissue zinc concentrations,and intestinal morphology in growing rabbits[J].World Rabbit Science,2017,25(1):43–49.

[17] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.GB/T 5009.14–2017 食品安全国家标准 食品中锌的测定[S].北京:中国标准出版社,2017.

[18] POURSAEID N,AZADBAKHT A,BALALI G R.Improvement of zinc bioaccumulation and biomass yield in the mycelia and fruiting bodies of pleurotus florida cultured on liquid media[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2015,175(7):3387–3396.

[19] 中国饲料工业协会,中国农业科学院饲料研究所.饲料生物学评定技术[M].北京:中国农业科技出版社,1996:36–39.

[20] WANG Z Y,ZHANG J,SU T T,et al.Screening of iron-and zinc-enriched yeast strain and optimization of cultivation conditions[J].Preparative Biochemistry and Biotechnology,2011,41(3):278–286.

[21] SINGH N,YADAV K K,RAJASEKHARAN R.Effect of zinc deprivation on the lipid metabolism of budding yeast[J].Current Genetics,2017,63(6):977–982.

[22] 杨靖鹏.乳酸菌对微量元素的富集及其生物活性评估[D].硕士学位论文.西安:西北农林科技大学,2017:10–31.

[23] STANLEY D,BANDARA A,FRASER S,et al.The ethanol stress response and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae[J].Journal of Applied Microbiology,2010,109(1):13–24.

[24] 康毅,刘树文,骆艳娥,等.不同发酵条件对酿酒酵母甘油产量的影响[J].食品科

学,2012,33(17):179–183.

[25] CHREPTOWICZ K,STERNICKA M K,KOWALSKA P D,et al.Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media[J].Letters in Applied Microbiology,2018,66(2):153–160.

[26] 管军军,张同斌,崔九红,等.木薯渣生产菌体蛋白的研究[J].安徽农业科学,2008,36(22):9556-9558,9596.

[27] 孔林.富锌酵母的选育培养及酵母锌的营养学评价[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2006,15–32.

[28] BURKETT J L,SCHWAB C R,STALDER K J,等.饲粮添加有机和无机微量元素对猪粪矿物元素排泄量及生长性能的影响[J].罗兰,译.养猪,2008(2):7–8.

[29] STAR L,VAN DER KLIS J D,RAPP C,et al.Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers[J].Poultry Science,2012,91(12):3115–3120.

[30] SANDOVAL M,HENRY P R,LUO X G,et al.Performance and tissue zinc and metallothionein accumulation in chicks fed a high dietary level of zinc[J].Poultry Science,1998,77(9):1354–1363.

[31] 索海青.肉仔鸡对蛋氨酸锌相对生物学利用率及其小肠磷吸收调控的研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2015:12–18.

[32] ABD EL-HACK M E,ALAGAWANY M,SALAH A S,et al.Effects of dietary supplementation of zinc oxide and zinc methionine on layer performance,egg quality,and blood serum indices[J].Biological Trace Element Research,2017,184(2):456–462.

[33] BAHAKAIM A,MAGIED H A,OSMAN S,et al.Effect of using different levels and sources of zinc in layer’s diets on egg zinc enrichment[J].Egyptian Poultry Science Journal,2014,34(1):39–56.

Screening of Zinc-Enriched Microorganism and its Relative Biological Value for Chickens

WEI Ailian DAI Zhangchao LU Chen DING Xiaoling DIAO Huan YAN Yibo LI Lyumu*

（*School of Animal Science and Technology*，*Anhui Agricultural University, Hefei* 230036, *China*）

Abstract: The purpose of this experiment is to screen out the microorganism that can efficiently transform inorganic zinc into microbial zinc, and evaluate the biological value of the zinc source for feeding chickens. First, from the 16 strains of laboratory microorganisms available in the laboratory, strains with a high conversion rate to inorganic zinc were selected, and then the factors such as inorganic zinc concentration, culture temperature, culture time and inoculum quantity of bacteria were affected thought single factor optimization and orthogonal optimization. Then, 20 Hy-line cocks at 18-week-old were randomly divided into 4 groups with 45 replicates per group and 1 chick per replicate. Chicks in the control group 1 and control group 2 fed the inorganic zinc（$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$）, dietary zinc contents were 60 and 90 mg/kg, respectively; chicks in the test group 1 and test group 2 fed the yeast zinc, dietary zinc contents were 60 and 90 mg/kg, , respectively. Each the pre trial period and the trial period were 5 days. The results showed that No. 58 strain (*Saccharomyces cerevisiae*) was the optimal inorganic zinc transforming strain, its inorganic zinc to microbial zinc conversion rate was 52.68%; under the condition of inorganic zinc concentration 1.5 mg/L, inoculum quantity of bacteria 4% and temperature 28 ℃ cultured for 66 h, the inorganic zinc to microbial zinc conversion rate could add up to 98.01%. Used the zinc-enriched yeast (yeast zinc) transform by the strain fed to chickens, the relative biological value of zinc in yeast zinc relative to zinc in zinc sulfate was 114.83%. In conclusion, No. 58 strain is a zinc-enriched microorganism with high conversion rate to inorganic zinc.

Key words: zinc-enriched microorganism; *Saccharomyces cerevisiae*; conversion rate; chickens; relative biological value

---

*Corresponding author, professor, E-mail： llm56@ahau.edu.cn （责任编辑　武海龙）